METHÄMOGLOBINWERTE IN DER NEUGEBORENEN-PERIODE MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON CYANOSE, IKTERUS, AUSTAUSCHTRANSFUSION

Martin Hessenbruch

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546015_0094

Aus der Kinderklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. K. Betke

METHÄMOGLOBINWERTE IN DER NEUGEBORENEN-PERIODE MIT BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON CYANOSE, IKTERUS, AUSTAUSCHTRANSFUSION

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Martin Hessenbruch
aus
Pforzheim

München 1972

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. med. K. Betke

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der Prüfung: 31.7.72

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Meiner Mutter und meiner Frau
in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A	Einleitung	1
B	Das Hämoglobin und seine Oxydation zu Methämoglobin	2
	1) Spontanoxydation	2
	2) Stoffwechsel des Erythrozyten und seine Besonderheiten	2
C	Methämoglobin	6
	1) Charakteristik	6
	a) Definition, spektrale Eigenschaften, Normalwerte	6
	b) Klinische Zeichen der Methämoglobinämie	6
	2) Ursachen der Methämoglobinämie	6
	a) Einteilung	7
	aa) reaktive Veränderungen des Blutfarbstoffes durch toxische Einwirkung	7
	bb) Enzymdefekte im Stoffwechsel des Erythrozyten	8
	cc) Strukturanomalien des Hämoglobins	10
	3) Methämoglobin - Bestimmungsmethoden	11
D	Eigene Untersuchungen	13
	1) Methodik	13
	a) Beschreibung der Ausgangsmethode	13
	b) Entwicklung der eigenen Methode	14
	c) Eigene Methode	17
	2) Untersuchte Personen	22
	3) Ergebnisse	23
	4) Unterschiede der Methämoglobinwerte zwischen den untersuchten Gruppen und ihre statistische Signifikanz	26

Seite

5) Diskussion 27

E Zusammenfassung 31

EINLEITUNG

Das Augenmerk bei der routinemäßigen Erfassung des Methämoglobinspiegels im Blut richtet sich normalerweise auf Werte in der Größenordnung von 5 - 10% des gesamten Hämoglobins und mehr, da es sich meist darum handelt, bei Vergiftungen oder bei angeborenen Anomalien das Ausmaß einer Methämoglobinämie zu bestimmen. Um jedoch Methämoglobinmengen zu erfassen, die unter physiologischen Bedingungen im Blut zu finden sind, ist eine wesentlich feinere Bestimmung notwendig.

Aufgabe dieser Arbeit ist es, nach einer Möglichkeit zu suchen, Methämoglobin mit einer Genauigkeit von ungefähr 0,1 bis 0,2 % des gesamten Hämoglobins zu bestimmen, um die normalerweise bestehenden Konzentrationsunterschiede des Methämoglobins bei Erwachsenen gegenüber Neugeborenen, sowie bei Neugeborenen unter verschiedenen Bedingungen exakt zu erfassen. Dabei wird von bekannten Methoden ausgegangen und nach einer Modifikation gesucht, die der geforderten Genauigkeit und Feinheit entspricht.

Das Hämoglobin und seine Oxadation zu Methämoglobin.

Die physiologische Aufgabe des Hämoglobins besteht vor allem im Transport des Sauerstoffs von der Lunge zu den Geweben. Diese seine Aufgabe ist eng an den molekularen Aufbau des Hämoglobins geknüpft, indem Sauerstoff reversibel an das zweiwertige Häm-Eisen angelagert wird. Dieses Häm-Eisen hat jedoch die Tendenz, spontan zu dreiwertigem Eisen zu oxydieren. Das so entstehende Methämoglobin (auch Hämiglobin oder Ferrihämoglobin) genannt) ist nicht mehr zum Sauerstofftransport geeignet.

Neill und Hastings (32) konnten nachweisen, daß diese Spontanoxydation zu Methämoglobin in vitro von der O_2-Spannung abhängig ist, und zwar dergestalt, daß hohe O_2-Spannung den Vorgang hemmt, niedere ihn fördert. Unterhalb eines pO_2 von 20 mm Hg wurde die Spontanoxydation wieder langsamer.

Eine der Hauptaufgaben des Erythrozytenstoffwechsels besteht in der Erhaltung des Eisens in zweiwertigem Zustand neben zwei anderen Aufgaben, nämlich der Aufrechterhaltung der Zellstruktur für ca. 120 Tage und des Konzentrationsgradienten für Kationen zwischen Erythrozyt und Plasma.

Dazu steht dem reifen Erythrozyten nur noch eine begrenzte Stoffwechselfähigkeit zur Verfügung, da ihm während der Reifung die Fähigkeit zur Bildung von Proteinen, Lipiden, Nucleinsäuren und des Hämmoleküls verloren geht. Die Glukose kann der Erythrozyt nur noch bis zur Milchsäure abbauen über Glykolyse und Hexosemonophosphatzyklus (HMP-Zyklus) (siehe Abb.1).

Zwei Besonderheiten jedoch zeichnen den Stoffwechsel des Erythrozyten aus:

1) er besitzt ein Fermentsystem, das in der Lage ist, Methämoglobin zu Hämoglobin zu reduzieren. Dies geschieht durch seine NADH-abhängige Methämoglobinreduktase. Neure Untersuchungen haben gezeigt, daß zwischen der Reduktase und dem Methämoglobin noch Cytochrom b_5

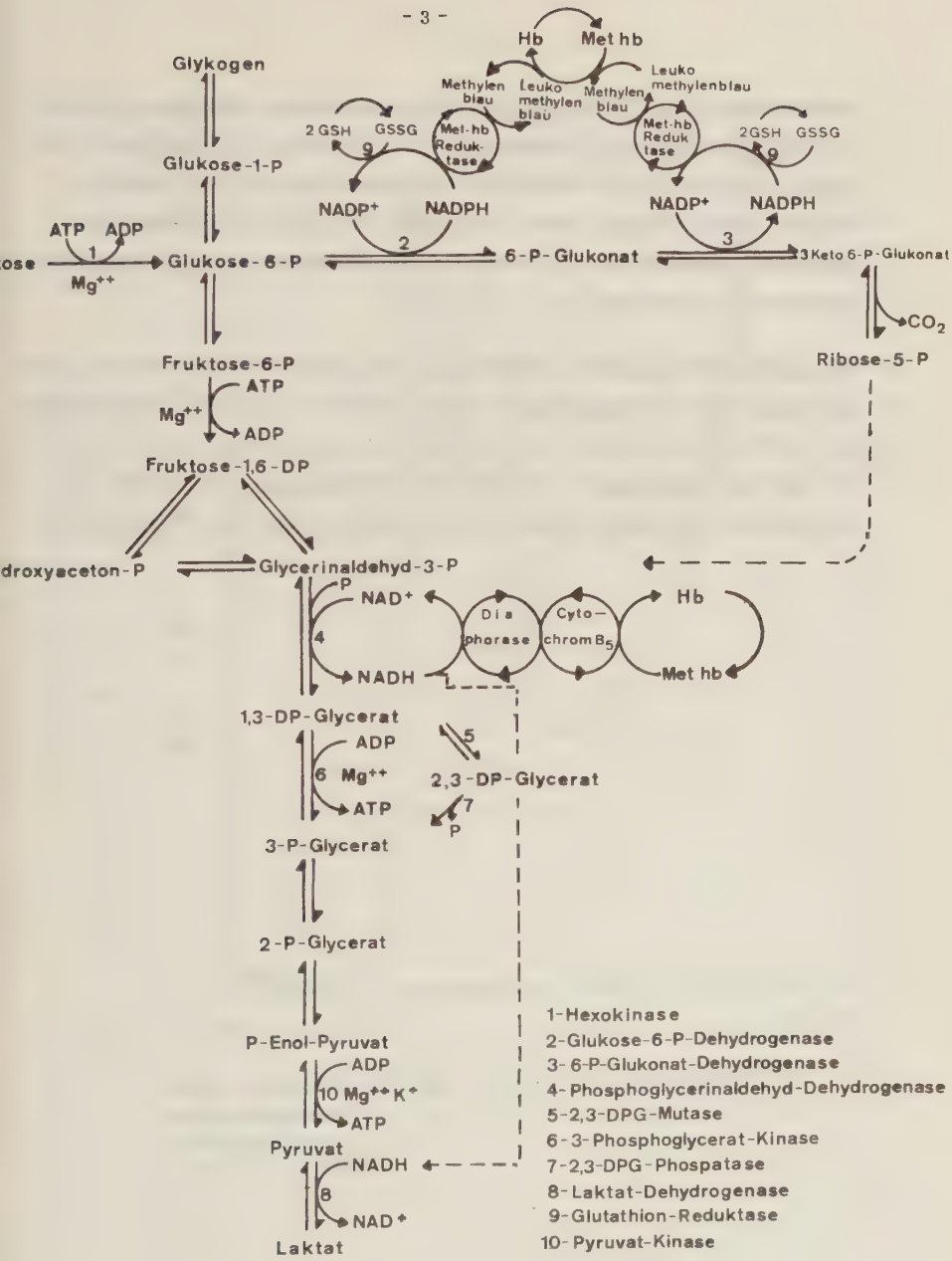

Abb.1: Schema der Glykolyse im Erythrocyten

eingeschaltet ist (17). Die Methämoglobinreduktase müßte daher korrekterweise Cytochrom b_5-Reduktase heißen. Im übrigen besteht noch eine andere Möglichkeit der Methämoglobin-Reduktion und zwar über den Pentose-Phosphat-Shunt unter Ausnutzung von NADPH. Dieses System funktioniert allerdings nur, wenn ein Redoxfarbstoff, z.B. Methylenblau, anwesend ist (siehe Abb. 1);

2) der sogenannte Rapoport-Luebbering-Zyklus. Diesem entspricht eine Umwandlung von 1, 3-Diphosphoglycerat (1, 3 DPG) in 2, 3-Diphosphoglycerat (2, 3 DPG) mit Hilfe einer spezifischen Diphosphoglyceratmutase (25, 26, 34) und einer Spaltung von 2, 3-DPG in 3-Phosphoglycerat (3-PG) und anorganisches Phosphat durch die 2, 3-Diphosphoglycerat-Phosphatase.

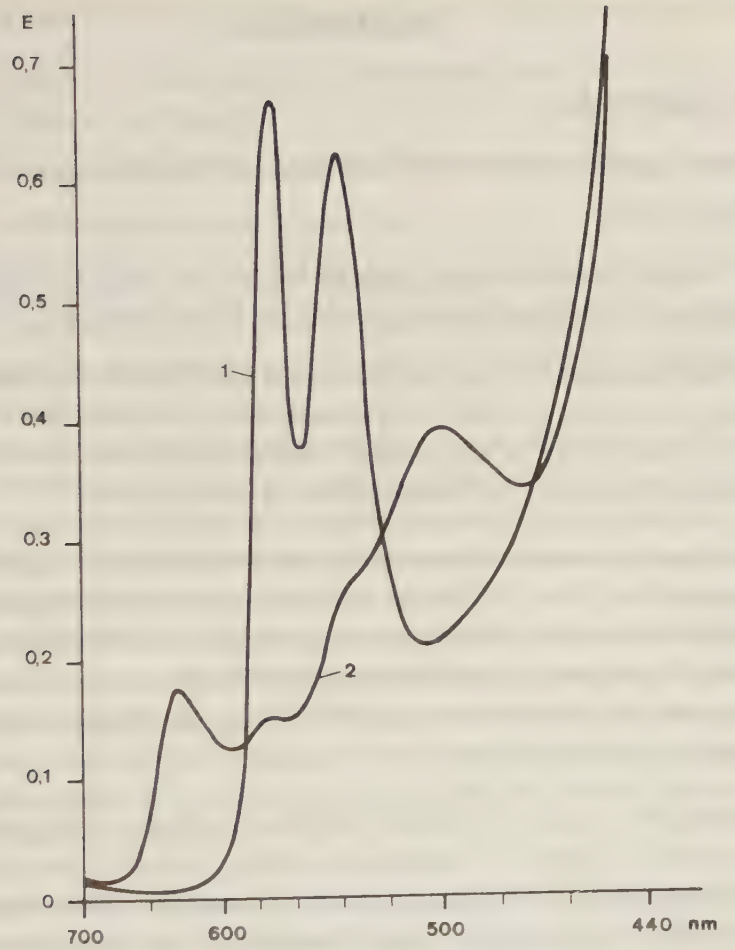

Abb. 2 : Spektralkurven von menschlichem Blutfarbstoff bei pH 6,8
1= Oxyhämoglobin
2= Methämoglobin
(nach Betke, 1968)

METHÄMOGLOBIN

A) Charakteristik

Methämoglobin ist Hämoglobin, in welchem das Häm-Eisen in dreiwertiger Form vorliegt.

Es hat eine charakteristische Absorptionskurve mit einem auffallenden Maximum im Bereich des roten Lichtes bei 630 nm (siehe Abb. 2) (5, 11).

Diese Eigenschaft wird zur qualitativen und quantitativen Bestimmung benutzt, wie dies auch bei anderen Zustandsformen des Hämoglobins möglich ist. Im Unterschied zu allen anderen Hämoglobinzustandsformen ist die spektrale Absorption von Methämoglobin pH-abhängig (10).

Die bisher gefundenen Normalwerte für Methämoglobin differieren zum Teil erheblich (24, 4, 23, 2, 29); die Angaben liegen für Erwachsene zwischen 0,5% (2) und 2% (29), für Säuglinge im ersten Trimenon zwischen 0,85% (4) und 2,12% (24) des gesamten Hämoglobins. Es besteht jedoch Einigkeit darüber, daß im ersten Trimenon die Normalwerte des Methämoglobins höher liegen als im späteren Alter.

Klinisch äußert sich ein erhöhter Methämoglobinspiegel durch eine graublaue oder lavendelblaue Zyanose, die auftritt, wenn mehr als 1,5 g% Methämoglobin im Blut vorhanden sind (2). Bemerkenswert ist die kaum beeinträchtigte Leistungsfähigkeit bei diesen Werten, die etwa 10% des gesamten Hämoglobins entsprechen. Beeinträchtigungen im Sinne von Kopfschmerzen, Tachykardie, Kurzatmigkeit treten ab Methämoglobinwerten von etwa 40% des gesamten Hämoglobins auf und der letale Grenzwert liegt bei 70 - 80% Methämoglobin.

B) Ursachen der Methämoglobinämie

Nach dem heutigen Stand des Wissens lassen sich die Ursachen für einen er-

höhten Methämoglobinspiegel im Blut in drei große Gruppen einordnen (2):

1) reaktive Veränderungen des Blutfarbstoffs durch toxische Einwirkung

2) Enzymdefekte im Stoffwechsel des Erythrozyten

3) Strukturanomalien des Hämoglobins.

Zu 1): Viele Stoffe sind in der Lage, Methämoglobinämie verschiedenen Ausmaßes hervorzurufen. Nach Kiese (19) sind hauptsächlich 3 Gruppen von Anilinderivaten die stärksten Methämoglobinbildner. Dies konnte auch von anderen Autoren bestätigt werden (30, 14, 22, 16).
In den letzten Jahren wurde bekannt, daß viele Lokalanästhetika in der Lage sind, den Methämoglobinspiegel im Blut zu erhöhen (13, 33, 16, 27, 29). Die dabei entstehenden Mengen an Methämoglobin sind mit 0,8% bis 7,4% in einer Höhe vorhanden, die zwar beim normalen Erwachsenen nicht gegen die Anwendung solcher Mittel spricht (29), jedoch ist Vorsicht bei ihrer Anwendung in der Pädiatrie geboten, da die Erythrozyten des kleinen Kindes, speziell des Säuglins im ersten Trimenon, noch HbF enthalten, das doppelt so empfindlich ist gegen oxydierende Substanzen wie HbA (3), und außerdem eine geringere Aktivität der Methämoglobinreduktase eine langsamere Methämoglobinreduktion verursacht, als dies bei älteren Kindern oder Erwachsenen der Fall ist (16).

Diese erhöhte Empfindlichkeit von Säuglingen gegenüber Methämoglobinbildnern bedingt auch drei, speziell bei Säuglingen auftretende, toxische Krankheitsbilder (2): die schon lange bekannte Windelstempel-Methämoglobinämie durch Vergiftung mit anilinhaltiger Wäschetinte; die Brunnenwasser-Methämoglobinämie, bei der Nitrat aus nitrathaltigem Wasser im Darm durch Bakterien zu Nitrit reduziert und anschließend resorbiert wird; die Spinat-Methämoglobinämie, die erst seit wenigen Jahren bekannt ist. Auch sie ist eine Nitritvergiftung.

Eine beachtenswerte Rolle als Ursache von Methämoglobinämie spielen auch

die Sulfonamide (2).

Die Therapie in allen diesen Fällen besteht in der Entfernung der Noxe und, falls nötig, in der intravenösen Gabe von Methylenblau, 1-2 mg/kg Körpergewicht in einer 0,1%igen Lösung.

1948 gelang es Gibson (9), in Fällen von hereditärer Methämoglobinämie mit autosomal rezessivem Erbgang einen Mangel an NADH-abhängiger Methämoglobinreduktase (Diaphorase) wahrscheinlich zu machen. Nach den neueren Vorstellungen von Hultquist und Passon (17) ist dies in der Richtung zu modifizieren, daß es sich um einen Mangel an Cytochrom b_5-Reduktase handelt; das Letztere reagiert dann mit dem Methämoglobin.

Wie aus Abb. 1 ersichtlich ist, besteht noch eine weitere Möglichkeit der enzymatischen Methämoglobinreduktion über eine NADPH-abhängige Reduktase, die zur Wirksamkeit Methylenblau oder andere Redoxfarbstoffe benötigt (20, 36). Gibt man Patienten mit angeborener enzymopenischer Methämoglobinämie Methylenblau in der oben angegebenen Menge, so verschwindet die Zyanose innerhalb von weniger als einer Stunde. Da ohne einen solchen Farbstoff dieser Stoffwechselweg nicht funktioniert, darf angenommen werden, daß physiologischerweise die Methämoglobinreduktion nur über NADH, Cytochrom b_5-Reduktase und Cytochrom b_5 abläuft. Wenn dennoch nur 15 - 40% Methämoglobin bei den Patienten gefunden werden, so wird dies erklärt durch das Redoxpotential der im Plasma bzw. im Erythrozyten vorhandenen Redoxstoffe (Ascorbinsäure, Glutathion) (7).

In der Glykolyse ist die Bilanz von NADH-Bildung und -Verbrauch ausgeglichen, deshalb muß es in der Glykolyse zur Anstauung von Pyruvat kommen, wenn durch die dauernde Methämoglobinreduktion NADH verbraucht wird, und damit die Pyruvathydrierung gehemmt wird. Nun hat der Erythrozyt die Möglichkeit, diese Anstauung auf der Stufe des 1,3-DPG aufzufangen, indem statt der Phosphoglyceratkinase-Reaktion die 2,3-DPG-Mutasereaktion abläuft. Das dabei entstehende 2,3-DPG kann in der Zelle gespeichert werden (34).

Aus dem Gesagten läßt sich leicht ersehen, daß nicht nur der Mangel an NADH-abhängiger Methämoglobinreduktase bzw. Cytochrom b_5-Reduktase und Cytochrom b_5, sondern alle Enzymmangelerkrankungen des Erythrozyten zur Methämoglobinbildung führen können, wenn sie die Bereitstellung von NADH vermindern oder unterbinden (31).

1961 fanden dann auch Townes und Lovell eine hereditäre Form der Methämoglobinämie, die dominanten Erbgang hatte und Normalaktivität der Methämoglobinreduktase zeigte. In den Erythrozyten bestand eine verminderte Konzentration an Glutathion, was nach Ansicht von Townes und Lovell eine reduzierte Aktivität der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase zur Folge hat und damit die NADH-Bildung vermindert ist. Unter den hereditären enzymopenischen hämolytischen Anämien sind nach Löhr (25) zwei Krankheitsbilder zu finden, die neben anderen Erscheinungen auch einen erhöhten Methämoglobinspiegel zeigen: enzymopenische hämolytische Anämie mit Pyruvat-Kinasemangel und enzymopenische hämolytische Anämie mit Diphosphoglyceromutase-Mangel. In beiden Fällen läßt sich die Erhöhung des Methämoglobinspiegels letztendlich durch verminderte NADH-Bereitstellung erklären: im Falle des Pyruvat-Kinase-Mangels kommt es zum Aufstau in der Glykolyse bei der Umwandlung von Phophoenolpyruvat zu Pyruvat. Die Möglichkeit, den Aufstau durch Ausweichen auf die Bildung von 2, 3-DPG zu beheben, ist durch die hohe Konzentration von ADP nicht besonders groß, da ADP die 2, 3-DPG-Bildung im Sinne einer Hemmung bei höherem ADP-Angebot kontrolliert (34). Dadurch setzt sich der Aufstau weiter fort, die Glykolyserate wird geringer und damit die Bereitstellung von NADH. Ähnlich liegen die Verhältnisse beim Diphosphoglyceromutase-Mangel; 2, 3-DPG kann nicht mehr gebildet werden, damit kommt es zur Konkurrenz von Methämoglobinreduktion und Lactatbildung bei der NADH-Ausnützung. Zusätzlich hemmt dieser Enzymmangel indirekt die Glykolyse (25), da die Monophosphoglyceromutase (PGM) das 2, 3-DPG als Cofaktor benötigt.

Damit haben wir vier Krankheitsbilder, die durch Enzymmangel bedingte Methämoglobinämie zeigen:

1) der Mangel an NADH-abhängiger Methämoglobinreduktase (Cytochrom b_5-Mangel);

2) die verminderte Aktivität der Glyceraldehyd-3-Phosphat-dehydrogenase bei Glutathionmangel;

3) der Pyruvat-Kinase-Mangel;

4) das Fehlen der Diphosphoglyceromutase.

Nur bei den unter 1) u. 2) genannten Bildern handelt es sich jedoch im klinischen Sinn um Methämoglobinämien, da nur in diesen Fällen eine Cyanose besteht.

Der Erbgang dieser Krankheiten ist, bis auf den Glutathionmangel, autosomal rezessiv (2, 25). Die Therapie besteht, wenn nötig, in der Gabe von Methylenblau, um die Zyanose zum Verschwinden zu bringen, und in weiteren kontinuierlichen Gaben von Ascorbinsäure (500-1000 mg/die).

3) Strukturanomalien des Hämoglobins

1948 beschrieben Hörlein und Weber (15) erstmalig eine chronische familiäre Methämoglobinämie, die autosomal dominant vererbt wurde. Es gelang ihnen der Nachweis, daß der Erkrankung ein anomales Globin zugrundeliegt.

Im Lauf der nächsten zwei Jahrzehnte wurden noch weitere familiäre Methämoglobinämien dieser Art gefunden.

Ihnen allen liegt eine Veränderung des Globinmoleküls zugrunde. Nährere Einzelheiten sind an anderer Stelle beschrieben (32, 2).

Diese nach Singer als Hb M bezeichneten Methämoglobintypen zeigen gegenüber dem Methämoglobin A neben gemeinsamen Eigenschaften (dreiwertiges Eisen, irreversible O_2-Bindung u.a.) auch sehr charakteristische, die sie von ihm unterscheiden (2):

1) unterschiedliche Spektralkurven

2) geringere oder keine Reaktion mit Cyanid, Fluorid und Acid.

Eine Therapie ist in Fällen von Hb M nicht möglich, da es sich um eine intramolekulare Veränderung handelt, die über den Eingriff in den Stoffwechsel des Erythrozyten nicht zu beeinflussen ist.

C) Methämoglobin-Bestimmungsmethoden

Im Jahre 1905 wurden durch van den Bergh und Hijmanns (1) spektroskopische Untersuchungsmethoden in die Klinik eingeführt. Damit war der entscheidende Schritt zur quantitativen Methämoglobinbestimmung getan.

Die Arbeit von Evelyn und Malloy (6) brachte dann 1938 die quantitative Methämoglobin-Bestimmungsmethode, die auch heute noch als die allgemein geübte Bestimmungsmethode angesehen werden darf. Sie fußt auf zwei Tatsachen:

1) Methämoglobin A reagiert mit KCN, wobei die spezifische Extinktion bei 630 nm für Methämoglobin verschwindet. Hämoglobin zeigt diese Reaktion nicht.

2) Hämoglobin kann durch Kaliumferricyanid vollständig zu Methämoglobin oxydiert werden.

Mißt man nun den Extinktionsverlust nach Zugabe von KCN bei 630 nm einmal im unbehandelten und einmal im mit Kaliumferricyanid vorbehandelten Hämolysat, so hat man die Möglichkeit, den Methämoglobingehalt in Prozenten des gesamten Hämoglobins auszudrücken. Diese Methode hat inzwischen viele Variationen erfahren (31, 24, 4, 34).

1964 beschrieb Führ (8) eine Möglichkeit, Methämoglobin zu bestimmen, indem man Methämoglobin in Kohlenoxydhämoglobin überführt und die Ex-

tinktionszunahme bei 546 nm mißt. 1967 veröffentlichte Jung (18) die Beschreibung einer Methode, die auf der vergleichenden Messung bei verschiedenen Wellenlängen basiert. Die Vorteile dieser Methode gegenüber der von Evelyn und Malloy, nämlich Genauigkeit der Werte auch bei geringen Methämoglobinmengen, konnten für diese Arbeit nicht genutzt werden, da die Methode für Reihenuntersuchungen zu umständlich war.

Eine grundsätzlich andersartige Bestimmungsmöglichkeit für Methämoglobin veröffentlichten Kleihauer und Betke 1963 (21). Sie wiesen intraglobuläres Methämoglobin durch Färbung in einem Blutausstrich nach. Eine quantitativ exakte Aussagemöglichkeit besitzt diese Methode nicht, sie ist vor allem für qualitative Untersuchungen der einzelnen Blutzellen nützlich.

Die beschriebenen Methoden sind vor allem dafür gedacht, Methämoglobinämien zu erkennen. Bei geringen Methämoglobinwerten, wie sie physiologisch vorhanden sind, ist die Bestimmungsschärfe nicht ausreichend für exakte Werte, weil die zu beobachtenden Extinktionsänderungen zu gering sind. Das wirkt sich besonders ungünstig aus bei der Erarbeitung von Normalwerten, da diese erfahrungsgemäß unter 1% Methämoglobin liegen.

Deshalb war es von Interesse, die Methodik so zu variieren, daß Methämoglobin auch in Größenordnungen von 0,1% noch zu erfassen war. Die von Jung 1967 angegebene Methode erschien uns für Reihenuntersuchungen zu umständlich. Es lag uns daran, eine sowohl einfache als auch exakte Methode zu entwickeln. Nur so war zu erhoffen, Normalwertbestimmungen durchführen zu können, die mit genügender Genauigkeit die Unterschiede in der Methämoglobinkonzentration im Blute des Erwachsenen gegenüber dem Neugeborenen, sowie beim Neugeborenen unter verschiedenen Umständen erfassen.

Eigene Untersuchungen

Methodik

Die Bestimmung von Normalwerten des Methämoglobinspiegels im Blute von gesunden Erwachsenen, Säuglingen und Neugeborenen ergibt erfahrungsgemäß Befunde von 1% und darunter. Deshalb war es wünschenswert, nach einer Möglichkeit zu suchen, geringste Mengen an Methämoglobin exakt messen und Differenzen von 0,1% noch erfassen zu können.

Als Grundlage dafür diente die Bestimmungsmethode nach Evelyn und Malloy (6) in der Modifikation, wie Marti (28) sie angibt:

0,2 ml Blut werden mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, 6 ml aqua dest. zur Hämolyse und 4 ml eines 0,1 molaren Phosphatpuffers von pH 6,64 zu dem verbleibenden Erythrozytenbrei hinzugefügt. Zur Entfernung der Stromata wird 10 Minuten mit 6000 U/min. zentrifugiert. Der Überstand wird abgehoben und in 2 Küvetten gefüllt. In eine der Küvetten wird ein Tropfen 5%ige Kaliumferricyanid-Lösung gegeben zur Umwandlung des gesamten Hämoglobin in Methämoglobin. Es sei dies das Hämolysat II (H II); das Hämolysat ohne Kaliumferricyanid-Zugabe sei H I. Man bestimmt die Extinktion beider Hämolysate bei 630 nm vor Zugabe ($H\ I_1$; $H\ II_1$) und nach Zugabe ($H\ I_2$; $H\ II_2$) von einem Tropfen einer 5%igen Kaliumcyanid-Lösung. Damit haben wir einen Extinktionswert für 100% Methämoglobin ($H\ II_1 - H\ II_2$) und können entsprechend den Methämoglobingehalt des unbehandelten Hämolysates in Prozenten des gesamten Hämoglobins berechnen.

$$\text{Berechnung: } \frac{(H\ I_1 - H\ I_2) \times 100}{H\ II_1 - H\ II_2} = \%\ \text{Methämoglobin des gesamten Hämoglobins.}$$

Bei Verwendung dieser Methode zeigte sich, daß die Differenz der Extinktion im Hämolysat I vor und nach Zugabe von Cyanid zu gering war für die genaue Bestimmung von Methämoglobinwerten unter 0,5 - 1%.

Um diese Differenz zu vergrößeren und damit exakt meßbar zu machen, mußten also höhere Konzentrationen des gesamten Hämoglobins im Hämolysat angestrebt werden. Andererseits war es wichtig, die notwendige Blutentnahme knapp zu halten, da vor allem junge Säuglinge untersucht werden sollten.

Im Laufe der Untersuchungen zeigte sich, daß bei Werten von 400 mg% bis 500 mg% Hb in der zu photometrierenden Lösung die Differenz der Extinktion von H I ausreichend groß wurde. Die Extinktion von H II vor Zugabe von Cyanid war dann jedoch so groß, daß erhebliche Fehler in der Ablesung der Extinktion zu erwarten waren. Um nicht einen zusätzlichen Pipettiergang durch Verdünnung von H II einführen zu müssen, wurde folgender Ausweg begangen: Es wurde eine Eichkurve erarbeitet, aus der die $H\,II_1$ - $H\,II_2$ Differenz aus der Hb-Konzentration im Ansatz abzulesen war. Hämoglobinlösungen mit Konzentrationen zwischen 80 mg% und 460 mg% wurden durch Zusatz von K_3FeCN_6 in Methämoglobin umgewandelt und vor sowie nach Zusatz von Cyanid bei 630 nm gemessen. Die gefundenen Aufhellungswerte, die also $H\,II_1$ - $H\,II_2$ Differenzen entsprechen, wurden gegen die Hb-Konzentration graphisch aufgetragen. Aus 54 Bestimmungen ergab sich die Kurve, wie sie in Abb. 3 dargestellt ist. Die sich ergebende Gerade gestattete es, auch bei höheren Gesamthämoglobin-Konzentrationen den Wert für $H\,II_1$ - $H\,II_2$ genau zu bestimmen. Wenn also in einem für die Messung von $H\,I_1$ - $H\,I_2$ vorgesehenen Hämolysat die Hb-Konzentration exakt bestimmt wurde, ließ sich aus dieser Kurve die zugehörige $H\,II_1$ - $H\,II_2$ Differenz ablesen.

Bevor mit dieser Methode die Erarbeitung von Normalwerten begonnen werden konnte, waren zwei wichtige Gesichtspunkte zu beachten:

1) bei möglichst geringen Blutmengen eine günstige Hämoglobinkonzentration im Hämolysat zu finden

2) Extinktionen bei 630 nm, die nicht durch Oxy-, Met- oder Cyanmethämoglobin verursacht waren, auszuschalten.

Zu 1): Da es galt, die Messungen als Doppelbestimmungen durchzuführen und die Küvette mit 2,5 ml Hämolysat gefüllt werden mußte, waren letztendlich mindestens 5 ml Hämolysat notwendig. Weitere 2-3 ml erwiesen sich als nötig, um bei der Herstellung des Hämolysats verworfen werden zu können (siehe später). Um die eingangs erwähnte günstige Konzentration von ungefähr 400 mg% Hb zu erreichen, waren deshalb 0,35 - 0,40 ml Citrat-Blut notwendig auf 1,5 ml aqua dest. + 7,5 ml 0,1-molaren Phophatpuffer pH 6.64.

Zu 2): es war schon früher bekannt, daß in nicht gereinigtem Hämolysat die noch vorhandenen Erythrozytenstromata die gefundenen Extintiktionswerte verfälschen können. In unserem Falle erwies sich zur Entfernung der Stromata als ausreichend, wenn nach Hämolysierung mit 1,5 ml aqua dest. 7,5 ml 0,1-molarer Phosphatpuffer pH 6,64 hinzugefügt wurden; damit hatte das Hämolysat ein pH von 6,68 - 6,70; des weiteren wurde 15 Minuten lang mit 5200 U/min zentrifugiert und das überstehende Hämolysat vorsichtig abgehoben. Dabei erwies sich als günstig, wenn 1-2 ml über dem Bodensatz zurückgelassen wurden.

Ein weiteres Problem war die eventuell mögliche spontane Methämoglobinbildung vom Zeitpunkt der Blutentnahme bis zum Zeitpunkt des eigentlichen Meßvorganges. Bei 38 Messungen wurde deshalb 3 Stunden nach der ersten Bestimmung eine Kontrolle durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei 31 Fällen der gefundene Methämoglobinwert geringfügig niedriger war als bei der ersten Bestimmung! (siehe Tabelle 1).
Um den übrigen Fällen von leicht erhöhtem Methämoglobinspiegel nach 3 Stunden Rechnung zu tragen, wurden gekühlte Reagenzien (Kühlschranktemperatur) verwandt und die Hämolysate während des Arbeitsvorganges so oft wie möglich in den Kühlschrank gestellt. Auf jeden Fall konnte aber auf den sonst üblichen CO-Zusatz zur Verhinderung einer Spontan-Oxydation des Hämoglobins im Hämolysat verzichtet werden.

Änderung der Methämoglobinkonzentration nach 3 Stunden in % des gesamten Hb

Ausgangswert	nach 3 Std.	Zunahme	Abnahme
1,38	0,63		0,75
0,64	0,43		0,21
0,56	0,25		0,31
0,33	0,35	0,02	
0,43	0,00		0,43
0,20	0,00		0,20
0,52	0,36		0,16
0,66	0,47		0,19
0,87	0,45		0,42
0,67	0,41		0,26
0,40	0,38		0,02
0,81	0,14		0,67
0,49	0,25		0,24
0,45	0,22		0,23
0,08	0,06		0,02
0,47	0,65	0,18	
0,12	0,32	0,20	
0,53	0,22		0,31
0,11	0,24	0,13	
0,70	0,62		0,08
0,35	0,36	0,01	
0,51	0,51		
0,65	0,40		0,25
0,60	0,46		0,14
0,44	0,39		0,05
0,26	0,19		0,07
0,57	0,34		0,23
0,44	0,26		0,18
0,75	0,46		0,29
0,59	0,61	0,02	
0,54	0,59	0,05	
0,32	0,41	0,09	
	Durchschnitt:	0,087	0,248

Tabelle 1: Änderung der Methämoglobinkonzentration im Hämolysat 3 Stunden nach der ersten Bestimmung der Methämoglobinkonzentration.

Nachdem dieser Fragenkomplex gelöst war, konnte die Methämoglobinbestimmung in folgender Weise ausgeführt werden:

METHODE

A) Reagenzien:

1) 0,9%ige NaCl-Lösung
2) 0,1 molarer Phosphatpuffer pH 6,64
3) aqua dest.
4) 5%ige KCN-Lösung
5) 7,5%ige K_3 $Fe(CN)_6$ - Lösung
6) Transformationslösung (0,2 g KCN + 0,2 g K_3 $Fe(CN)_6$ auf 1 l aqua dest.)

B) Eichkurve (Abb. 3)

1) Die Erythrozyten von 0,4 ml Blut auf der Zentrifuge mit 10 ml 0,9%iger NaCl waschen, Überstand absaugen.

2) Sediment hämolysieren mit 1,5 ml aqua dest., 7,5 ml Puffer hinzufügen, 15 Minuten bei 5200 U/min. zentrifugieren, Überstand vorsichtig abheben, 2 ml und Bodensatz belassen;

3) Hämoglobinbestimmung im Überstand:
0,1 ml Hämolysat werden zu 10 ml Transformationslösung hinzugefügt, 20-30 Minuten stehengelassen, Messung der Extinktion bei 540 nm gegen aqua dest., Spaltöffnung 0,03 mm;
Verstärker des Anzeigegerätes (PMQ II Zeiss) ist entsprechend einzustellen vor jeder einzelnen Messung; eine eventuell vorhandene Spaltautomatik ist abzustellen.

BERECHNUNG

(Gefundene Extinktion - Extinktion der Küvette mit aqua dest.) x 1,43 x 10 = g% Hämoglobin.

Der Faktor 1,43 ergibt sich aus einem spezifischen Extinktionskoeffizienten von 11,3 für 1 m Äquivalent/lit. CN Hb (Äquivalentgewicht 16 114).

4) Einstellen des Hämolysats auf die gewünschte Konzentration. Entnahme von 0,1 ml Hämolysat zur erneuten Hb-Bestimmung.

5) 2,5 ml Hämolysat werden in eine Küvette gefüllt, 0,04 ml $K_3 Fe(CN)_6$ hinzugefügt, mit Glasstab umgerührt, 5 Minuten stehengelassen.

6) Messen der Extinktion bei 630 nm; dann werden 0,04 ml KCN zugegeben, umgerührt, 5 Minuten stehengelassen und erneut nach 5 Minuten die Extinktion abgelesen. Die Differenz dieser beiden Extinktionen ist der Wert für 100% Methämoglobin bei der gemessenen Hämoglobinkonzentration.

Bei 4) wurden Gruppen von Proben mit stufenweise ansteigender Hb-Konzentration gebildet und zwar um 80 mg%, um 130 mg% um 160 mg%, um 200 mg%, um 270 mg%, um 380 mg%, um 450 mg%.

Dadurch ließen sich Mittelwerte aus diesen Gruppen ohne weiteres vergleichen und rechnerisch behandeln.

Die Mittelwerte der Extinktionsdifferenzen wurden in Abhängigkeit von den Mittelwerten der dazugehörigen Hämoglobinkonzentrationen auf Millimeterpapier aufgetragen. Dasselbe Verfahren wurde angewandt für die Mittelwerte aus verschiedenen Gruppen, sowie für den Durchschnitt der Mittelwerte.

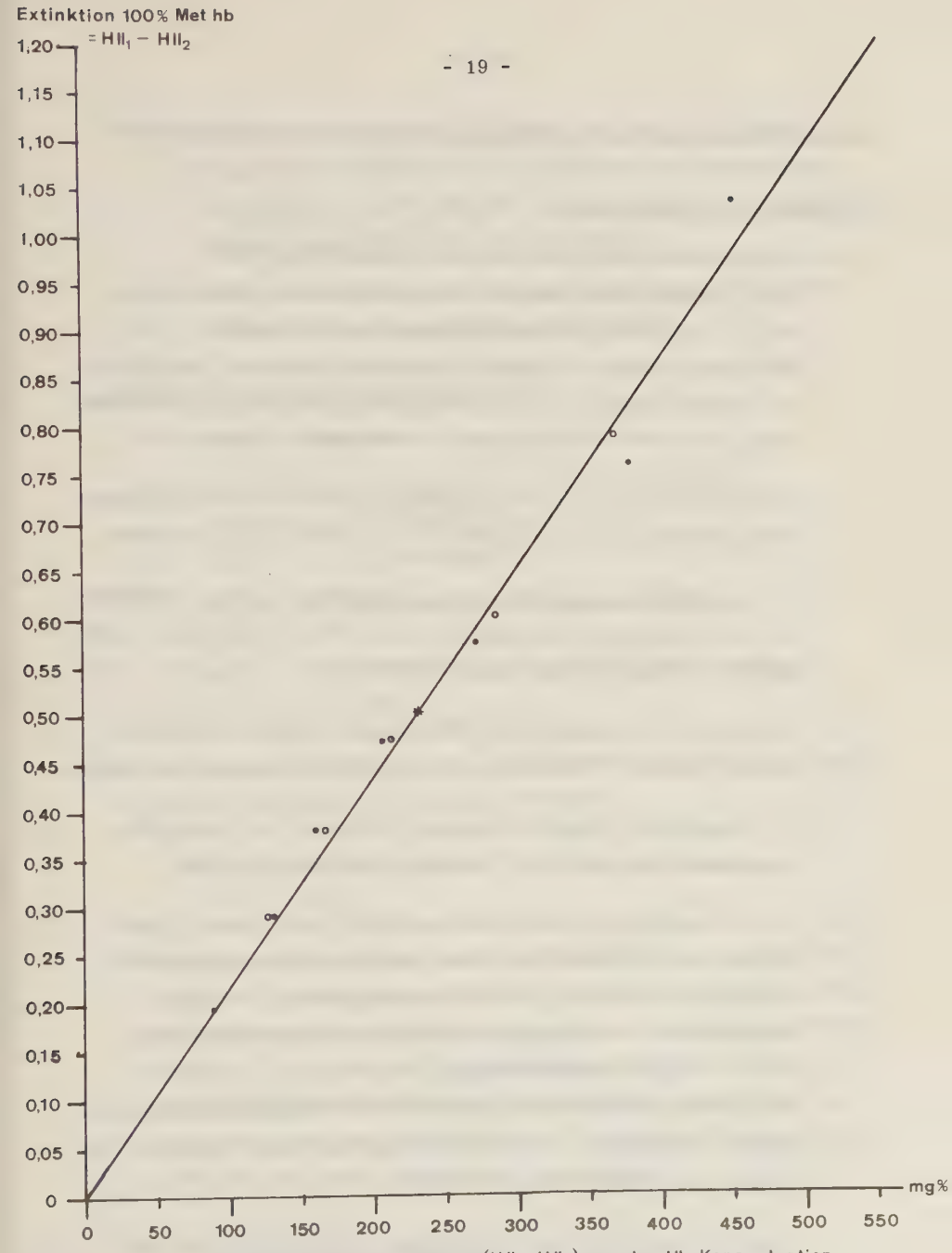

Abb. 3: Abhängigkeit der Extinktion 100% Met hb ($HII_1 - HII_2$) von der Hb-Konzentration
•=Mittelwert aus jeweils 8 Doppelbestimmungen
o=Mittelwert aus jeweils 3 dieser Gruppen
*=Mittelwert aus allen Gruppen

Auf diese Weise ergab sich die Gerade, wie sie in Abb. 3 dargestellt ist.

C) Methämoglobin-Bestimmung

1) Blutentnahme: Beim Erwachsenen venöses Citrat-Blut.
Beim Kleinkind oder Säugling: Venenpunktion und auffüllen eines mit 0,15 ml Citrat gefüllten Reagenzglases auf möglichst 1 ml. Wird weniger Blut auf gleiche Citratmenge genommen, sind später zur Messung anstatt 0,35 ml Blut 0,40 ml und mehr zu verwenden. Dabei ist auf pH-Verschiebungen im Hämolysat zu achten.

2) 0,35 ml Blut werden in ein Reagenzglas gefüllt, mit 10 ml 0,9%iger NaCl gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

3) 1,5 ml gekühltes aqua dest. wird zur Hämolyse zu dem verbleibenden Erythrozytenbrei hinzugefügt. Nach 2 Minuten gibt man 7,5 ml gekühlten Phosphat-Puffer hinzu. Schütteln.

4) 15 Minuten zentrifugieren mit 5200 U/min. Überstand wird vorsichtig abgehoben. Bodensatz und 1-2 ml Hämolysat bleiben zurück.

5) Vom abgehobenen Hämolysat werden jeweils 0,1 ml in zwei Reagenzgläschen mit je 10 ml Transformationslösung gegeben.

6) 2,5 ml Hämolysat werden in die Meßküvette (Schichtlänge 1 cm) gegeben und bei 630 nm mit einem Spalt von 0,03 mm und entsprechender Verstärkung die Extinktion gemessen (= $H I_1$).
Spaltautomatik ist abzuschalten. (Diese Angaben gelten für das Photometer Zeiss M4QIII/PMQ II).
Dann werden diesem Hämolysat 0,04 ml KCN-Lösung zugesetzt, mit Glasstab umgerührt, 5 Minuten stehengelassen und erneut die Extinktion bei 630 nm (= $H I_2$) bestimmt.

7) Dieser Vorgang wird nach sorgfältigem Spülen der Küvette mit aqua dest. mit weiteren 2,5 ml Hämolysat wiederholt.

8) a) Umschalten des Gerätes auf 540 nm, Spaltbreite 0,03 mm, entsprechende Verstärkung am Anzeigegerät. Bestimmung der Extinktion der Meßküvette mit aqua dest. gegen Kontrollküvette, die ebenfalls aqua dest. enthält.

b) Sodann wird die Extinktion der hämolysathaltigen Transformationslösungen aus Arbeitsgang 5) bestimmt.

9) Berechnung des Methämoglobingehaltes

a) Hämoglobingehalt:

(Extinktion aus Hämoglobin-Transformationslösung
- Extinktion der Küvette mit aqua dest.)
x 1,43 x 10 = g% Hämoglobin

2 Ergebnisse, Mittelwert der Ergebnisse dient zur

10) Ablesung des Wertes für $H\,II_1 - H\,II_2 = 100$ % Methämoglobin auf der Eichkurve (Abb. 3).

11) Berechnung des Methämoglobingehaltes der beiden Hämolysatproben aus Arbeitsgang 6 und 7 nach der Formel:

$$\frac{(H\,I_1 - H\,I_2) \times 100}{(H\,II_1 - H\,II_2)} = \%\ \text{Methämoglobin.}$$

12) Der Mittelwert aus diesen beiden Methämoglobinwerten ist das Ergebnis der Methämoglobin-Bestimmung. Auf die Berücksichtigung des Verdünnungseffektes durch Zugabe der 0,04 ml Reagenzlösung zu den 2,5 ml Hämolysat (= 1,6%) wurde verzichtet, da dieser Effekt in sämtlichen Arbeitsgängen der gleiche ist, sowie auch auf Grund einer geringen Eigenextinktion von KCN bei 630 nm, welche den Verdünnungseffekt noch weiter verringerte.

Untersuchte Personen

Mit der oben angegebenen Methode wurden Methämoglobin-Bestimmungen bei folgenden Personengruppen durchgeführt:

1) Gesunde Erwachsene

2) Gesunde Säuglinge im 1. Trimenon, und zwar
   a) Neugeborene bis zum Alter von 36 Stunden und
   b) Neugeborene im Alter von 36 Stunden bis zum 10. Lebenstag
   c) Säuglinge vom 11. Lebenstag bis zum Ende des 1. Trimenon;

3) Kinder mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen

4) Neugeborene mit Atemnotsyndrom

5) Neugeborene und Säuglinge, die eine Austauschtransfusion erhalten hatten.

Dabei wurde darauf geachtet, ob die Kinder

6) cyanotisch oder

7) nicht cyanotisch waren, und ob

8) Ikterus oder

9) kein Ikterus vorlag.

Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 übersichtlich zusammengefaßt.

ERGEBNISSE

	Alter	An-zahl	Methb	Standard-abweichung	Extremwerte
1) Erwachsene	20-40 Jahre	30	0,34%	± 0,12%	0,12 - 0,57%
2) Säuglinge	bis Ende 1.Trimenon	59	0,55%	± 0,25%	0,04 - 1,40%
davon	a) 0-36 Stunden	15	0,53%	± 0,14%	0,20 - 0,75%
	b) 36 Stunden b.10. Tag	29	0,59%	± 0,28%	0,04 - 1,40%
	c) 11. Tag b.Ende 1.Trimenon	15	0,51%	± 0,27%	0,08 - 0,87%
3) Kinder mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen	bis 8 Monate	4	0,48%	± 0,20%	0,28 - 0,67%
4) Neugeborene mit Atemnotsyndrom	0-22 Tage	7	0,55%	± 0,20%	0,28 - 0,87%
5) Neugeborene und Säuglinge mit Austauschtransfusion	bis 1 Monat	7	0,23%	± 0,17%	0,04 - 0,44%
Es waren dabei:					
6) cyanotisch		7	0,61%	± 0,37%	0,28 - 1,38%
7) nicht cyanotisch		52	0,54%	± 0,23%	0,04 - 1,40%
8) ikterisch		11	0,60%	± 0,27%	0,40 - 1,38%
9) nicht ikterisch		48	0,54%	± 0,24%	0,04 - 1,40%

Tabelle 2: Mittelwerte des Methämoglobingehalts im Blut bei den verschiedenen untersuchten Gruppen.

Methämoglobinwerte

1) Bei 30 Erwachsenen im Alter von 20 bis 40 Jahren war das Methämoglobin in einer Höhe von 0,34% des gesamten Hb im Durchschnitt vorhanden. Standardabweichung $\pm$ 0,12%, Extremwerte 0,12 - 0,57%.

2) Säuglinge, davon

   a) insgesamt bis zum Ende des ersten Trimenon bei 59 Säuglingen das Methämoglobin 0,55% mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,25%, wobei die Extremwerte 0,04 bis 1,40% waren.

      aa) davon waren 0-36 Stunden alt 15 Säuglinge, bei welchen das Methämoglobin 0,53% mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,14% bei Extremwerten von 0,20 - 0,75% betrug.

      bb) Bei 29 Säuglingen im Alter von 36 Stunden bis zum 10. Tag betrug das Methämoglobin im Durchschnitt 0,59% mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,28% bei Extremwerten von 0,04 - 1,40%.

      cc) Bei den übrigen 15 Säuglingen im Alter vom 11. Tag bis Ende des 1. Trimenon war das Methämoglobin im Durchschnitt 0,51%, die Standardabweichung $\pm$ 0,27% bei Extremwerten von 0,08 - 0,87%.

3) Bei 4 Kindern im Alter bis zu 8 Monaten mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen war das Methämoglobin 0,48% mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,20% bei Extremwerten von 0,28 - 0,67%.

4) Bei 7 Neugeborenen mit Atemnotsyndrom im Alter von 0 - 22 Tagen war das Methämoglobin 0,55% bei einer Standardabweichung von $\pm$ 0,20% bei Extremwerten von 0,28 - 0,87%.

5) Bei 7 Neugeborenen und Säuglingen im Alter bis zu einem Monat, welche eine Austauschtransfusion erhalten hatten, betrug das Methämoglo-

bin 0,23% mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,17% bei Extremwerten von 0,04 - 0,44%.

Des weiteren fand sich bei den untersuchten Säuglingen:

6) bei 7 cyanotischen Kindern ein Methämoglobin im Durchschnitt von 0,61% bei einer Standardabweichung von $\pm$ 0,37% und Extremwerten von 0,28 - 1,38%.

7) Bei 52 nicht cyanotischen Säuglingen war das Methämoglobin 0,54% mit einer Standardabweichung von $\pm$ 0,23% bei Extremwerten von 0,04 - 1,40%.

8) Das Methämoglobin von 11 ikterischen Kindern war im Durchschnitt 0,60% bei einer Standardabweichung von $\pm$ 0,27% mit Extremwerten von 0,40 - 1,38%.

9) Bei 48 nicht ikterischen Säuglingen war das Methämoglobin im Durchschnitt 0,54% bei einer Standardabweichung von $\pm$ 0,24% bei Extremwerten von 0,04 - 1,40%.

Unterschiede der Methämoglobinwerte zwischen den untersuchten Gruppen und ihre statistische Signifikanz

(Student - T - Test)

1) Gruppe der Erwachsenen mit 0,34% Methb gegenüber der gesamten Säuglingsgruppe mit 0,55% Methb signifikant niedriger ($p < 0,0005$)

2) Innerhalb der Gruppe der Säuglinge war

   a) die Gruppe 0-36 Std. mit 0,53% Methb ($p < 0,35$)
   b) die Gruppe 36 Std. -10 Tg. mit 0,59% Methb ($p < 0,15$)
   c) die Gruppe 10 Tg.-1. Trimenon mit 0,51% ($p < 0,2$)

   jeweils gegenüber den übrigen Säuglingen der Unterschied statistisch nicht signifikant.

3) Die Gruppe der Kinder mit Austauschtransfusion war mit 0,23% Methb

   a) gegenüber den übrigen Kindern beziehungsweise Säuglingen mit 0,59% Methb signifikant niedriger ($p < 0,0005$)
   b) gegenüber Erwachsenen mit 0,34% Methb zwar niedriger, jedoch nicht statistisch signifikant ($p < 0,3$)

4) Neugeborene mit Atemnotsyndrom wiesen mit 0,55% Methb gegenüber den übrigen Säuglingen des ersten Trimenon mit 0,55% Methb keinen Unterschied auf ($p < 0,5$)

5) Cyanotische Säuglinge mit 0,61% Methb waren gegenüber nicht cyanotischen Säuglingen mit 0,54% Methb statistisch nicht signifikant unterschieden ($p < 0,25$).

6) Desgleichen waren die Werte der ikterischen Säuglinge mit 0,60 % Methb gegenüber den nicht-ikterischen Säuglingen mit 0,54% Methb statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p < 0,25$).

DISKUSSION

Die Methämoglobinwerte, die in dieser Arbeit gefunden wurden, sind für alle untersuchten Gruppen etwas niedriger als vergleichbare Werte, soweit sie in der Literatur angegeben sind:

1) Die Normalwerte für Erwachsene liegen mit 0,82% Methämoglobin bei Kravitz et al. (23), mit 0,74% bei Künzer und Savelsberg (24), mit 0,45% bei Nagy und Horpacsy (31), sowie mit 0,5 - 1,0% bei Heubner et al. (12) höher als die hier gefundenen 0,34%. Nur Jung (18) gibt mit 0,21% einen noch niedrigeren Wert an. Er verwendete jedoch eine andere Methode der Messung, sodaß die Werte nicht vergleichbar sind.

2) Für Säuglinge im ersten Trimenon geben Künzer und Savelsberg (24) 2,12% an, während Betke und Rau (4) 0,86% fanden gegenüber 0,55% in der vorliegenden Arbeit.

3) Kravitz et al. (23) fanden bei Neugeborenen bis zum 10. Lebenstag die Methämoglobinkonzentration mit 1,5% höher als bei einer Kontrollgruppe von Säuglingen und Kleinkindern von einem Monat bis 1 Jahr Lebensalter, bei welchen der Durchschnittswert bei 1,2% lag.

Die Gründe für die in dieser Arbeit gefundenen vergleichsweise niedrigen Methämoglobinwerte dürften in den unterschiedlichen Methoden zu suchen sein; bei geringen Methämoglobinkonzentrationen ist der Extinktionsunterschied im Hämolysat zu gering bei der Bestimmungsmethode nach Evelyn und Malloy und ihren Modifikationen, um noch exakte Aussagen zu ermöglichen. Dies wurde hier durch die vorstehend beschriebene Methode vermieden.

Es konnten in der Literatur keine Angaben gefunden werden über die Methämoglobinwerte bei Kindern mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen, Neugeborenen mit Atemnotsyndrom und Neugeborene und Säuglinge mit Austauschtransfusion sowie über die Frage, ob bei Zyanose oder Ikterus in vivo

veränderte Methämoglobinwerte vorliegen.

Die cyanotischen Kinder wurden vor allem deswegen untersucht, weil es zu prüfen galt, ob ein dauernd erhöhter Anteil an nicht mit O_2 gesättigtem Hb den Betrag an Methämoglobin erhöht. Neill und Hastings (32) hatten schon 1925 gezeigt, daß die Spontanoxydation des Blutfarbstoffes bei sinkender O_2-Spannung ansteigt. Ein Maximum der Spontanoxydation wird etwa bei Halbsättigung erreicht. Unsere Untersuchungen zeigen, daß diese Erwartung nicht zutrifft. Die cyanotischen Kinder unterschieden sich mit 0,61% Methb statistisch nicht von den nicht cyanotischen Kindern mit 0,54% Methb.

Offensichtlich ist die Reduktionsaktivität in den Erythrozyten so hoch, daß eine vielleicht vorhandene raschere Spontanoxydation voll ausgeglichen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Methämoglobinwert von Erwachsenen mit 0,34% signifikant niedriger gefunden als bei Säuglingen im ersten Trimenon mit 0,55%. Innerhalb dieser Gruppe von Säuglingen war zwar der Wert für Neugeborene bis zum Alter von 36 Stunden mit 0,53% geringfügig niedriger als bei der Gruppe von Neugeborenen im Alter von 36 Stunden bis zum 10. Lebenstag mit 0,59%, doch war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant. Ebenso lag der Mittelwert der Gruppe von Säuglingen im Alter von 11 Tagen bis zum Ende des ersten Trimenon in vergleichbarer Höhe mit 0,51% Methb. Dies könnte nach den vorliegenden Befunden bedeuten, daß bereits bei Geburt ein gegenüber dem Erwachsenen erhöhter Methämoglobinspiegel vorliegt, der während der ersten 10 Lebenstage noch weiter ansteigt, jedoch schon vor Ablauf des ersten Trimenon wieder auf Werte absinkt, die sich denen Erwachsener nähern. Wie im einzelnen der Abfall des Methämoglobinspiegels im Ablauf des ersten Trimenons tatsächlich stattfindet, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da die Fallzahl für eine statistisch signifikante Unterscheidung der Gruppen zu gering war.

Kinder mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen zeigten mit 0,48% Methämoglobin einen etwas niedrigeren Wert als die Kinder im ersten Trimenon. Dies ist verständlich, da sowohl Säuglinge im ersten Trimenon wie auch äl-

tere Kinder bis zu 8 Monaten untersucht wurden. Zusätzlich zeigt dieser Befund, daß bei Herz- und/oder Gefäßmißbildungen die Methämoglobinwerte nicht verändert sind.

Bei Neugeborenen mit Atemnotsyndrom wurde Methämoglobin mit 0,55% geringfügig niedriger gefunden als bei der Gruppe der Säuglinge im Alter von 36 Stunden bis 10 Tage (0,59%). Diese geringe Differenz läßt sich aus dem Alter der Säuglinge erklären, die mit einem Durchschnittsalter von 12 Tagen älter als die erwähnte Gruppe waren. Vielleicht sind auch noch zusätzliche Faktoren, vor allem die Therapie, als Ursache für diesen etwas niedrigeren Methämoglobingehalt zu berücksichtigen.

Den wohl auffälligsten Befund ergab die Untersuchung von Neugeborenen und Säuglingen mit Austauschtransfusion: es waren Werte zu erwarten, die denen von Erwachsenen entsprechen. Interessanterweise jedoch waren die gefundenen Methämoglobinspiegel auch Erwachsenenwerten gegenüber noch niedriger mit im Mittel 0,23%! Den Ursachen für diesen auffälligen Befund systematisch nachzugehen, überstieg den Rahmen dieser Arbeit. Es bestand jedoch bei 3 der 7 untersuchten Kinder die Möglichkeit zu wiederholten Untersuchungen:

Fall A ♀ erhielt am 1. Lebenstag Austauschtransfusion. Am 1. Tag nach Austausch fanden sich 0,44%, am 20. Tag nach Austausch 0,41% und am 40. Tag 0,34% Methämoglobin.

Im Falle Z II ♀ betrug der Methämoglobinspiegel acht Tage nach Austausch 0,04%, 29 Tage nach Austausch 0,16% Methämoglobin. Der Austausch war wiederum am 1. Lebenstag gemacht worden.

Bei G I ♂ wurde am 4. Lebenstag die Austauschtransfusion vorgenommen; drei Tage nach Austausch wurden 0,18%, 24 Tage nach Austausch 0,59% Methämoglobin gefunden.

Mit diesen Befunden läßt sich die Entwicklung des Methämoglobinspiegels

nach Austauschtransfusion nicht sicher interpretieren. Es scheint nur sicher zu sein, daß die betreffenden niedrigen Werte noch nach vielen Tagen so niedrig befunden werden (im Fall A handelt es sich um den höchsten aller gefundenen Werte nach Austauschtransfusion), womit rasch ausgleichbare Veränderungen des Konservenblutes (pH-Änderung, Zusätze) als Ursache unwahrscheinlich werden. Möglicherweise handelt es sich um eine Auswirkung der besonderen Situation von Erwachsenen-Erythrozyten im Stoffwechselverbund des Neugeborenen-Kreislaufes.

Ikterus hatte keinen Einfluß: mit 0,60% Methb bei ikterischen Kindern bestand kein signifikanter Unterschied zu einer Kontrollgruppe ohne Ikterus mit 0,54% Methämoglobin.

Die Untersuchungen haben mit einer exakteren Methode, als sie bisher angewandt wurde, gezeigt, daß die in der Literatur niedergelegten verschiedenen Mitteilungen über leicht erhöhte Methämoglobinwerte bei jungen Säuglingen real sind. Sie haben weiter gezeigt, daß gewisse häufige Sonderbedingungen der Neugeborenenperiode wie Ikterus und Cyanose für diese erhöhten Werte keine Rolle spielen. Es muß sich also um eine besondere Eigenart der Erythrozyten des jungen Kindes handeln.

Dies wird besonders dadurch erhärtet, daß Erwachsenen-Erythrozyten unter den Bedingungen des Neugeborenen-Kreislaufes die erhöhten Methämoglobinwerte nicht zeigen, sondern im Gegenteil extrem niedrige Prozentsätze haben.

Es ist durch eine Anzahl von Untersuchungen gesichert, daß einerseits das fetale Hämoglobin rascher zu Methämoglobin oxydierbar ist als Erwachsenen-Hämoglobin, und andererseits, daß der Mechanismus der Methämoglobin-Reduktion im Neugeborenen-Erythrozyten vermindert aktiv ist. Dies kann die etwas erhöhten Methämoglobinwerte bei Neugeborenen zwanglos erklären.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst die Eigenschaften des Hämoglobins und des Methämoglobins sowie die Wechselwirkungen mit dem Erythrocytenstoffwechsel behandelt.

Die eigenen Untersuchungen zielten darauf ab, die Methämoglobin-Bestimmungsmethode nach Evelyn und Malloy so zu modifizieren, daß sie bei einfacher Handhabung eine Genauigkeit von 0,1% bei Methämoglobinwerten um 1% erlaubte. Dies ließ sich vor allem dadurch erreichen, daß die Blutfarbstoffkonzentration im Ansatz stark erhöht wurde.

Mit dieser Methode durchgeführte Untersuchungen an gesunden Erwachsenen, gesunden Säuglingen sowie an Kindern mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen, mit Atemnotsyndrom und mit Austauschtransfusion zeitigten folgende Ergebnisse:

Erwachsene 0,34% $\pm$ 0,12 Methämoglobin, Säuglinge im ersten Trimenon 0,55% $\pm$ 0,25%, davon Neugeborene während der ersten 36 Stunden 0,53% $\pm$ 0,14%, von 36 Stunden bis zum 10. Lebenstag 0,59% $\pm$ 0,28%, vom 11. Lebenstag bis zum Ende des ersten Trimenon 0,51% $\pm$ 0,27%, Kinder mit Herz- und/oder Gefäßmißbildungen 0,48% $\pm$ 0,20%, Säuglinge mit Atemnotsyndrom 0,55 $\pm$ 0,20%, Kinder nach Austauschtransfusion 0,23% $\pm$ 0,17%.

Damit bestätigte sich der aus der Literatur bekannte erhöhte Methämoglobinwert bei jungen Säuglingen. Da bei Kindern mit Cyanose und mit Ikterus kein signifikanter Unterschied gegenüber den anderen Neugeborenen gefunden wurde, kann ein Einfluß dieser Faktoren auf den Methämoglobinspiegel ausgeschlossen werden.

Dem unerwartet niedrigen Methämoglobinwert von Neugeborenen nach Austauschtransfusion müßte in gesonderten Untersuchungen nachgegangen werden.

Literaturverzeichnis

1. van den Bergh,A., Hijmanns A.: Arch.Klin. Med. 83: 96, 1905

2. Betke,K.: Methämoglobinämien. Sonderdruck aus: Handbuch der Kinderheilkunde, herausgegeben von H. Opitz und F. Schmid. Sechster Band, 870, 1967, Springer-Verlag.

3. Betke,K.: Das Hämoglobin und die Hämoglobinanomalien. Sonderdruck aus: Handbuch der Inneren Medizin, begründet von L. Mohr und R. Staehlin, herausgegeben von H. Schwiegk. Zweiter Band, Erster Teil, Fünfte Auflage, 636, Springer-Verlag 1968.

4. Betke,K., Rau H.: Zur Frage der Neigung junger Säuglinge an Methämoglobinämien zu erkranken. Zugleich ein Beitrag zur Trimenonpathologie. Arch. Kinderheilkunde 145: 195, 1954.

5. Drabkin,D.L., Austin,J.H.: Spectrophotometric studies. II. J. biol. Chem. 112, 51, 1935/36.

6. Evelyn,K.A., Malloy,H.T.: Microdetermination of Oxyhemoglobin, Methemoglobin and Sulfhemoglobin in a Single Sample of Blood. J. Biol. Chem. 126: 655, 1938.

7. Finch, C.A.: Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia. New Engl. J.Med. 239, 470 (1948).

8. Führ, J.: Die Bestimmung von Hämiglobin (Methämoglobin) im Blut. Med. Mschr. 18: 568, 1964.

9. Gibson, Q.H.: The reduction of methaemoglobin in red blood cells and studies on the cause of idiopathic methaemoglobinaemia. Biochem. J. 42: 13, 1948.

10. Haurowitz, F.: Zur Chemie des Blutfarbstoffes. 3. Mitt. zur Kenntnis des Methämoglobins und seiner Derivate. Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 138, 68 (1924).

11. Heilmeyer, L.: Medizinische Spektrophotometrie. Jena, Gustav Fischer 1933.

12. Heubner, W., Kiese, M., Stuhlmann, M., Schwartzkopf-Jung: Der Hämiglobingehalt normalen Blutes. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exper. Path. und Pharmakol. 204: 313 (1947).

13. Hjelm, J.: Methaemoglobinaemia following Lignocaine. Lancet 1: 53, 1965.

14. Hjelm, M., de Verdier, C.H.: Biochemical effects of aromatic amines - I. Methaemoglobinaemia, Haemolysis and Heinzbody formation induced by 4,4-diaminodiphenylsulfons. Biochem. Pharmacol. 14: 1119, 1965.

15. Hörlein, H., Weber, G.: Über chronische familiäre Methämoglobinämie und eine neue Modifikation des Methämoglobins. Deutsche Med. Wschr. 73: 476, 1948.

16. Hughes, J.R.: Infantile methemoglobinemia due to benzocaine suppository. J. Pediat. 66: 797, 1965.

17. Hultquist, D.E., Passon, P.J.: Catalysis of methemoglobin-reduction by erythrocyte cytochrome b_5 and cytochrome b_5 -reductase Nature, New Biol. 229, 252-54, 71.

18. Jung, F.: Ermittlung und Charakter des "normalen" Methämoglobins im Blut. Deutsch.Gesundh. 22: 1105, 1967.

19. Kiese, M.: Relationship of Drug Metabolism to Methemoglobin Formation. Ann.N.Y.Acad.Sci. 123: 141, 1965.

20. Kiese, M.: Erhaltung des Blutfarbstoffes in funktionsfähigem Zustand. Klin.Wschr. 81, 1946.

21. Kleihauer, E.: Methode und Mechanismus des Nachweises von Methämoglobin in Erythrocyten eines Blutausstrichs. Klin.Wschr. 42: 853, 1964.

22. Knorr, D., Palmié: Über eine Vergiftung mit reinem Anilin. Mschr. Kinderheilk. 116: 110, 1968.

23. Kravitz, H., Elegant, L.D., Kaiser, E., Kagan, B.M.: Methemoglobin Values in Premature and Mature Infants and Children. Amer.J.Dis.Child. 91: 1, 1955.

24. Künzer, W., Savelsberg, W.: Der Hämiglobingehalt kindlichen Blutes. Klin.Wschr. 1951: 648.

25. Löhr, G.W.: Hämatologische Enzymologie. Helv.Med.Acta 30: 428, 1963.

26. Löhr, G.W.: Die enzymopenischen Erythropathien. Verh.Deutsch.Ges.Inn.Med. 70: 495, 1964.

27. Lund, P.C., Cwik, J.C.: Propitocaine (Citanest) and Methemoglobinemia. Anaesthesiology 26: 569, 1965.

28. Marti, H.R.: Normale und Anomale Menschliche Hämoglobine. Springer-Verlag 1963: 49.

29. Mazze, R.I.: Methemoglobin concentrations following intravenous regional anesthesia. Anaesth.Analg. (Cleveland) Vol. 47 No. 2: 122, 1968.

30. Munroe, W.D., Lawson, W.J., Holcomb, Th.M.: Hemolytic Anemia Due To Aminosalicylic Acid, Anemia with Methemoglobinemia. Americ.J.Dis.Child. 108: 426, 1964.

31. Nagy, G., Horpácsy, G.: Untersuchungen über den Hämoglobin- und Methämoglobingehalt des Blutes Porphyria cutanea-kranker und gesunder Kontrollpersonen.
Arch. Klin. Exp. Derm. 235: 192, 1969.

32. Neill, J. M. und B. Hastings: The Influence of the Tension of Molecular Oxygen upon Certain Oxydations of Hemoglobin.
J. of Biol. Chem. 63: 479, 1925.

33. Poppers, P.J., Vosburgh, G.J., Finster, M.: Methemoglobinemia following epidural analgesia during labor. A case report and literature review. Amer. J. Obstet. Gynec. 96: 630, 1966.

34. Schröter, W., Winter, P.: Zur Bedeutung des 2,3-Diphosphoglycerat-Zyklus in Erythrocyten: Beziehungen zwischen Methämoglobin- und 2,6-Dichlorphenolindophenol, Glykolyse und 2,3-Diphosphoglyceratbildung. Blut XIV: 16, 1966.

35. Singer, K.: Hereditary hemolytic disorders associated with abnormal Hemoglobins. Amer. J. Med. 18: 633, 1955.

36. Wendel, W.B.: Oxydation by erythrocytes and the catalytic influence of methylen blue. II Methemoglobin and the effect of cyanide.
J. biol. Chem. 102, 385 (1933).

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. K. Betke, Leiter der Kinder-Klinik im von-Haunerschen Kinderspital an der Universität München, möchte ich an dieser Stelle meinen Dank aussprechen für die Überlassung des Themas sowie für die wertvollen Anregungen.

Des weiteren gebührt mein Dank Herrn Dr. Tor-Pong Sanguansernesri, der durch methodisch-kritische Hinweise meine Arbeit sehr erleichtert hat.

Herrn Professor Dr. med. Fikentscher, Leiter der II. Frauenklinik an der Universität München, möchte ich dafür danken, daß mir Blutproben von Neugeborenen zur Verfügung gestellt wurden.

Herzlich danke ich meiner Frau, die in liebevoller Geduld all die kleinen Ungelegenheiten ertrug, die diese Arbeit mit sich brachte.

LEBENSLAUF

Geburt:	am 17. Juli 1944 zu Bad Liebenzell im Schwarzwald
Schulbildung:	Besuch der Waldorfschule in Pforzheim von 1951 bis 1964. Externes Abitur vor dem Oberschulamt Karlsruhe im Frühjahr 1964.
Universitätsausbildung:	Studium der Humanmedizin an der Universität München ab dem Sommersemester 1964 bis zum Sommersemester 1970.
	Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 17.10.1965 mit der Gesamtnote III; Ärztliche Vorprüfung am 17.7.1967 mit der Gesamtnote II; Ärztliche Prüfung am 16.12.1970 mit der Gesamtnote II.
Famulatur:	9 Wochen Innere Medizin, 6 Wochen Chirurgie, 6 Wochen Gynäkologie.
Heirat:	am 26. August 1967.